

(19)日本国特許庁 (J P)

## (12)公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2000-515132

(P2000-515132A)

(43)公表日 平成12年11月14日 (2000.11.14)

(51)Int.Cl.  
A 61 K 31/337  
9/107  
47/16  
47/34

識別記号

F I  
A 61 K 31/337  
9/107  
47/16  
47/34

マーク\* (参考)

(21)出願番号 特願平10-504432  
 (22)出願日 平成9年6月28日 (1997.6.28)  
 (25)翻訳文提出日 平成10年12月28日 (1998.12.28)  
 (26)国際出願番号 PCT/US97/11503  
 (27)国際公開番号 WO98/00128  
 (27)国際公開日 平成10年1月8日 (1998.1.8)  
 (31)優先権主張番号 08/672,594  
 (32)優先日 平成8年6月28日 (1996.6.28)  
 (33)優先権主張国 米国 (U.S.)

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 43 頁)

(71)出願人 ボード オブ リージェンツ, ザ ユニバ  
ーシティ オブ テキサス システム  
アメリカ合衆国 テキサス 78701, オー  
スティン, ウエスト 7ティーエイチ ス  
トリークト 201  
 (72)発明者 アンダーソン, ポージュ エス.  
アメリカ合衆国 テキサス 77005, ヒュ  
ーストン, カロリナ ウェイ 2632  
 (74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名稱】 安定な非中毒性処方物中の非経口パクリタキセル

(57)【要約】

タキサンアナログ、好ましくはパクリタキセルの安定かつ有効な処方物が開示される。処方物は、使用前に水性脂質乳濁液中に希釈されるこの薬物のジメチルアセトアミドおよびポリエチレングリコール溶液を含む。処方物は、タキサン感受性腫瘍に対する非経口薬物として有効である。

## 【特許請求の範囲】

1. タキサンアナログ、ジメチルアセトアミド (DMA) 、ポリエチレングリコール (PEG) 、および水性脂質乳濁液を含む、非経口投与のための薬学的組成物。
2. 前記タキサンアナログがパクリタキセルである、請求項 1 に記載の薬学的組成物。
3. 前記タキサンアナログが約 1 mg/ml～約 5 mg/ml の濃度である、請求項 1 に記載の薬学的組成物。
4. 前記水性脂質乳濁液が大豆油乳濁液である、請求項 1 に記載の薬学的組成物。
5. 前記PEGが約400の分子量を有する、請求項 1 に記載の薬学的組成物。
6. DMAおよびPEGを約1:3 (v/v) の比で含むとさらに規定される、請求項 1 に記載の薬学的組成物。
7. 脈管内投与のためのパクリタキセル組成物を調製する方法であって、以下の工程：  
パクリタキセルをDMA中に約100mg/mlまでの濃度で溶解する工程；  
パクリタキセル溶液にポリエチレングリコール (PEG) をDMA : PEG の比で約1:3 (v/v) で添加して、約25mg/mlパクリタキセルまでの濃度を有するパクリタキセルストック処方物を達成する工程；および  
水性脂質乳濁液を添加して、約 1 mg/ml～約 5 mg/ml のパクリタキセル濃度を達成する工程、  
を包含する、方法。
8. 請求項 7 に記載の方法により調製される薬学的組成物。
9. パクリタキセル感受性腫瘍を処置する方法であって、以下の工程：  
約1.3 (v/v) のDMA : PEG比でジメチルアセトアミド (DMA) およびポリエチレングリコール (PEG) を溶解し、そして約 1 mg/ml～5 mg/ml の最終パクリタキセル濃度を達成するように最終的に水性脂質乳濁液中に溶解されたパクリタキセル含有薬学的組成物を得る工程；および  
該腫瘍を該薬学的組成物と接触させる工程、

を包含する、方法。

10. 前記腫瘍が被験体の中にあり、そして前記薬学的組成物が非経口的に投与される、請求項9に記載の方法。

11. 前記被験体が、ヒトの卵巣ガン患者、乳ガン患者、悪性リンパ腫患者、肺ガン患者、またはカボージ肉腫患者である、請求項10に記載の方法。

12. 前記薬学的組成物が、約135mg/m<sup>2</sup> 体表面～約250mg/m<sup>2</sup> 体表面の投薬量でに投与される、請求項9に記載の方法。

13. 約25mg/mlバクリタキセルおよび1:3のv/v比のジメチルアセトアミド：ポリエチレングリコールを含む、バクリタキセルストック処方物。

14. 前記ポリエチレングリコールが、約400の分子量を有する、請求項13に記載のバクリタキセルストック処方物。

### 【発明の詳細な説明】

#### 安定な非中毒性処方物中の非経口パクリタキセル

本発明は、ポリオキシエチル化ヒマシ油またはエチルアルコールの副作用への患者の曝露を伴わない、悪性疾患の処置および抑制のために有用であるタキサン(taxane) アナログの処方物に関する。

#### 発明の背景

パクリタキセルは、最近10年間に臨床試験に入った、最も有望な化学療法剤の1つである。これは、卵巣ガンおよび乳ガンに対する強い活性が示されており、そして現在、数種の異なる悪性疾患に対して第II相～第III相の臨床試験を行っている。利用可能な結果は、薬物がリンパ腫および異なる種類の白血病に対してもかなりの価値のものであり得ることを示す。その限られた出発物質は北米原産のイチイの木(pacific yew tree)の樹皮を利用しているので、薬物の供給は、厄介な抽出方法に起因して制限されている。この欠点は、このイチイの木の針状葉ならびに樹皮からパクリタキセルを抽出する技術の最近の開発により、ある程度緩和されている。豊富に供給される、天然に利用可能な前駆体物質からのタキソール(taxol)の半合成生産のための技術がまた、開発されている。パクリタキセルは現在、非経口投与のために利用可能であるが、ヒトでの使用のために承認された処方物は、Bristol-Myers Squibbから利用可能な1つの処方物(Taxol<sup>TM</sup>)しかない。この処方物は、50% (V/V) アルコール、ならびに88倍過剰のポリオキシエチル化ヒマシ油(Cremophor<sup>®</sup> EL)を含む。ポリオキシエチル化ヒマシ油は、重篤な副作用を誘導する可能性を有する。利用可能なパクリタキセル処方物の急性および共通の臨床的副作用は、重篤である：列挙すると、致死的な結果となる危険性がある、呼吸困難、低血圧、血管性水腫、全身性蕁麻疹、および最も顕著なアナフィラキシー様反応である。さらに、高いCremophor<sup>®</sup> EL濃度は、「可塑剤」、すなわち、注入物(Infusate)中への使い捨て用の注入袋およびチューブセットの製造において使用される化学物質の漏出を促進する。そして、

これらの化学物質に曝露した患者の(長期の)危険性は未知である。現在用いられる薬物調製物からの重篤な急性の副作用のこの経験は、ジフェンヒドラミン、

H<sub>2</sub>-アンタゴニスト、およびさらにコルチコステロイドの前投薬を要求している。

それゆえ、別の溶媒系に基づくタキサンの処方物の必要性がある。これは、危険な副作用を緩和し、そしてパクリタキセルおよび関連するタキサン化合物を用いる従来の用量治療および高用量化学療法の両方のために、より穏やかな薬物供給を提供する。

#### 発明の要旨

本発明は、共溶解性 (cosolvency) の原理に基づいて、再処方された薬物を非中毒性溶媒系を用いて提供して、安定な薬物処方物を得るが、一方Cremophor<sup>®</sup>ELおよびエチルアルコールの使用を排除する、代替的な薬学的に受容可能な溶媒ビヒクルを提供することにより、従来技術におけるこれらの欠陥を克服することを探求する。これらの処方物は、脈管内投与の後に、薬物の薬物動態／薬力学を潜在的に調節し、そしておそらくまた、副作用のスペクトルを変更する。なぜなら、例えば、現在使用されるパクリタキセル養生法は、平均サイズの成体患者において20~30ml程度の大量のCremophor<sup>®</sup>ELの投与を要求するからである。

本発明はまた、プロトタイプ物質としてパクリタキセルを利用する、非経口使用のためにタキサンアナログを可溶化するための組成物および手順の知見としての広範な局面において記載され得る。本知見の1例として、タキサンアナログ（例えば、パクリタキセル）を一次ビヒクルとしての有機溶媒（すなわち、ジメチルアセトアミド (DMA) またはジメチルスルホキシド (DMSO) ）に溶解し、次いでその後の水性溶媒中の（最終）希釈のために、二次溶媒（例えば、ポリエチレングリコール400 (PEG) ）で溶液中の薬物を安定化する。好ましい最終溶媒は、水性脂質乳濁液（例えば、乳濁化大豆油 (Kabi-Pharmacia Inc., Stockholm, SwedenからのIntralipid<sup>™</sup>) ）である。本明細書中に記載される例は約400の平均分子量を有するポリエチレングリコールを利用するが、PEGの分子量は約300~約10,000で変化し得ることが理解される。さらに、有用であると意図される

他の共溶媒は、例えば、種々のアミドのような溶媒を含むがこれらに限定されない。

い。これらの例は、2-ピロリジノン、1-メチル-2-ピロリジノン、およびさらなる硫黄含有化合物（例えば、スルホラン、テトラメチレンスルホン、およびテトラメチレンスルホキシド）である。これらの薬剤は、全て、タキサン化合物の可溶化のための使用が可能であるはずの双極性非プロトン性溶媒の例であるが、これらは薬学的溶媒としての以前に確立され記録された使用をほとんどまたは全く有さない。

好みい脂質溶媒は、特定の利点を提供する。なぜなら、プロトタイプタキサンアナログとしてのパクリタキセルは高度に親油性であり、そして沈殿または分解に起因した薬物活性の喪失を伴わずに24時間を超える注入の治療的価値が系統的および便宜的に調査され得るように、水性希釈剤中の薬剤を安定化するために、水性脂質乳濁液の使用が意図される。Intralipidが容易に利用可能であり、そして日常的な非経口栄養支持物として承認されている。当該分野で公知である他の脂質乳濁液が、ヒトにおいて非中毒性であり、そして低アレルギー誘発性である

ことが理解される。同様に、利用可能な脂質乳濁液は、Liposyn®、Soyacal®、およびTravemulsion®を含む。

さらに、パクリタキセルは、感光性であり、そして最終溶媒としての水性脂質乳濁液の使用は、薬物は注入されるが、光に対する防御を提供する。

本発明による1つのパクリタキセル処方物は、室温で数ヶ月間、25mg/mlで安定であることが実証される。最終的な使用処方物は、1～5mg/mlで少なくとも7日間安定であり、そして市販の処方物を参照溶液として用いて2つのヒト白血病細胞株に対してアッセイした場合、完全な細胞傷害活性を保持する。さらに、ビヒクル処方物自体は、溶血アッセイにおいてアッセイした場合、非中毒性である。別の処方物は、明らかに細胞破壊濃度のパクリタキセルが、3mg/kg体重の注射後に、齧歯類モデルにおいて、何時間も維持されることを実証するために用いられている。それゆえ、本明細書中に記載される処方物は、ヒトおよび家畜における悪性疾患の脈管内注入治療のための現在利用可能なパクリタキセル調製物に対して、薬学的に受容可能な代替物を提供する。この代替物は、現在利用可能な臨床調製物よりもかなり副作用が少ないという潜在的な利点がある。本発明の

調製物で処置可能な悪性疾患は、ヒトの卵巣ガン、乳ガン、悪性リンパ腫、肺ガン、またはカポージ肉腫を含む。他の（親油性）のタキサンアナログの可溶化のためのこれらの新規な溶媒系の使用を推定して、これらの非常に活性な抗ガン剤の臨床試験を容易にすることが可能であるはずである。

本発明の利点は、以下を含む：

1. ヒトおよび家畜における悪性疾患の処置のために利用し得る、親油性タキサンアナログの薬学的に安定かつ非経口的に受容可能な新規な処方物。得られる処方物は、共溶解性の薬学的原理に基づく。これは、薬学産業で通常利用され、そしてFDAにより承認される；
2. 最終溶媒としての、臨床的に受容可能な水性の非経口注入液と混合され得る新規な処方物；
3. 標的としてヒト悪性細胞株を利用して組織培養において評価した場合、完全な細胞傷害活性を保持する新規な処方物：および
4. ラットモデルにおけるこの処方物の静脈内投与の後に、以前に利用可能な処方物で得られた薬物動態と匹敵する薬物動態で、脈管内投与に受容可能である処方物。

本発明は、ポリオキシエチル化ヒマシ油（例えば、Cremophor®）またはエチルアルコールの使用を回避し、その結果、薬物が物理的および化学的に安定なままであり、そして非溶解薬物および／または溶媒ビヒクルからの過度の中毐性を伴わずに、臨床的に有意な肺瘍殺傷効果を示すために有効であることが意図される薬物用量で脈管内に投与され得る、複合した薬学的に受容可能な液体ビヒクル中のタキサンアナログ（例えば、パクリタキセル）の可溶化のための組成物および方法を提供する。

共溶解性の原理に従って、好ましい処方物は、無水N,N-ジメチルアセトアミド(DMA)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、およびポリエチレングリコール-400(PEG)の組合せを、二次／最終水性溶媒に混和できる一次（ストック）溶媒として利用する。この例は、通常生理食塩水、水中の5%デキストロース、および最後に、水性大豆脂質乳濁液（Intralipid™）である。これらの溶媒は、タキサンアナログ（例えば、パクリタキセル）が適切に可溶化され、そして単独または

他の薬物との組合せにおいて、ヒトの投与のために安全であるビヒクルの例である。

記載されたビヒクルは、パクリタキセルを0.1mg/mlから25mg/mlより多くの範囲の濃度で溶解するために利用され得る。この範囲は、これらの薬物に感受性の悪性疾患を処置するためにインピボで活性な細胞傷害濃度を得るために必要な投薬量の投与をカバーすることを意図する。それゆえ、本発明は、患者をCremophor<sup>®</sup>EL、エチルアルコール、または他の望ましくない溶媒の重篤かつ潜在的に有害な作用への曝露を伴わないで悪性疾患を治療するための臨床的実施への、パクリタキセルおよび他のタキサンアナログの導入を可能にする。

より広い意味では、本発明は、ほとんど水溶性でないタキサンアナログ（例えば、パクリタキセル）を脈管内に投与する方法を記載する。この実施形態は、薬物の乏しい腸吸収を回避し、ならびにこの薬剤の現在利用可能な唯一の処方物で遭遇している、ポリオキシエチル化ヒマシ油およびエチルアルコールの重篤な全身性の有害な作用を避ける。新規な処方物の著しい安定性は、現在利用可能な処方物が臨床的に受容可能な注入液における長期の安定性を欠くのとは対照的に、長期の非経口注入を可能にし、従って、これらの薬物の治療的潜在能力を増強することが予想される。

#### 本出願において使用される略語

ATCC; American Tissue Culture Collection, Rockville, MD

Cremophor<sup>®</sup>EL; ポリオキシエチル化ヒマシ油の商品名

DMA; 無水N,N-ジメチルアセトアミド

DMF; ジメチルホルムアミド

FDA; Federal Food and Drug Administration

HPLC; 高速液体クロマトグラフィー

HL-60; ヒト骨髓性白血病細胞株

IMDM; Iscoveの改変Dulbecco培地 (GIBCO, Grand Island, New York, NY)

Intralipid<sup>™</sup>; 大豆油から製造され、そして非経口栄養のためにKabi-Pharmacia, Inc., Stockholm, Swedenにより市販される水性脂質乳濁液の商品名

KBM-7/B5; ヒト骨髓性白血病細胞株

MeOH; メタノール

MTT; 3-[4,5-ジメチルチアゾール-2-イル]2,5-ジフェニルテトラゾリウム-ブ

ロミド

NCI; National Cancer Institute

NH<sub>4</sub>-アセテート; 酢酸アンモニウム

NS; 通常生理食塩水 (150mM NaCl)

PBS; リン酸緩衝化生理食塩水 (Dulbeccoの処方、pH7.4)

PEG; ポリエチレン glycole-400

PG; プロピレングリコール

PTFE; ポリテトラフルオロエチレン (フィルター) 、Teflon™

RT; 室温 (22°C)

Sep Pak Vac 1 cc tCZ™; Waters Inc., Milford, MAからの使い捨て用の抽出カラム

SDS; ドテシル硫酸ナトリウム

#### 図面の簡単な説明

図1。25mg/mlの濃度でのDMA:PEG (1:3, v/v) ストック処方物中での室温 (RT, 22°C) および4°Cでのパクリタキセルの安定性。4°Cでの安定性は、現在 (4.5ヶ月) まで、RTで保存されたサンプルについて記録された安定性と重なる。

図2。25mg/mlの濃度でのDMA:PEG (1:3, v/v) ストック処方物中での4°C、室温 (RT, 22°C) 、40°C、および60°Cでのパクリタキセルの加速安定性試験。4°C およびRTでのサンプルについて得られた安定性曲線は、60日間の観察期間全体にわたって100%重なった。

図3。DMA:PEG (1:3, v/v) の最終使用処方物中に、次いで、Intralipidで1mg/mlおよび5mg/mlまでさらに希釈された、RTでのパクリタキセルの安定性。2つの異なるロットの可溶化パクリタキセルを調整し、そして平行に試験した。

図4。安定性試験において使用されたHPLCアッセイについての、パクリタキセル濃度の曲線下面積 (AUC) に対する標準曲線。類似の標準曲線を、薬理学試

験について作製した。

図5A～図5Bは、Waters  $\mu$  Bondapak Phenylカラムを用いた図5Aにおける安定性試験においてHPLCアッセイから得られたクロマトグラムの例である。注射されたサンプル容積 ( $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ) は図5Bにおいては $20\mu\text{l}$ であり、そして図5CにおいてはC. symmetry<sup>TM</sup>カラムを用い、注入された容積は $20\mu\text{l}$ （図5B； $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 、および図5Cにおいて； $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ）であった。HPLC条件は、実施例1の下で記載された通りであった。

図6。DMA:PEG:Intralipidの、それぞれ、パクリタキセルなし（□）およびあり（■）での最終使用処方物の溶血潜在能力。

図7。60分間の薬物露出後に試験管内腫瘍細胞感受性試験（clonogenic assay）で評価した、2つのヒト細胞株KBM-7/B5およびHL-60に対する、DMA:PEG:Intralipid使用処方物中でのパクリタキセルの細胞傷害活性。陽性コントロールとして、市販の調製物中のパクリタキセルを供した。詳細については、本文の実施例2を参照のこと。

図8。HPLCの前に、実施例3（23～24頁）に記載されるようにSepPakカートリッジで抽出された血漿サンプルのクロマトグラム；a) ブランクの血漿、b) 新規な処方物中でパクリタキセルで $10\mu\text{g}/\text{ml}$ までスパイクした血漿、およびc) 藥理学試験からの信頼性のあるクロマトグラム。ここで、ラットに、 $3\text{mg}/\text{kg}$ の薬物を注射した。この血液サンプルを、注射の5分後に得た。

図9。雄性Sprague-Dawleyラットにおいて $3\text{mg}/\text{kg}$ で注射したパクリタキセル（-△-新規処方物、DMA:PEG:Intralipid）の、血漿濃度の時間に対するパターン。陽性コントロールとして、ラットに市販の調製物を注射した（□）。

#### 例示的な実施態様の説明

本発明は、ほとんど水溶性でないタキサンアナログの非経口または脈管内投与のための処方物であって、アルコールおよびポリオキシエチル化ヒマシ油の両方を欠き、そしてこれらの薬剤に対して感受性である悪性腫瘍の制御を改善するために有用である処方物を提供する。例示的な処方物は、ヒトの悪性疾患についての当該分野で受け入れられているモデル（例えば、ヒト白血病細胞株KBM-7/B5お

よりHL-60)に適用した場合に有効であることが本明細書中に示される。このタキサン(例えば、パクリタキセルおよびドセタキセル(docetaxel))の、つまり、非経口抗ガン剤としての使用は、医療の実施において以前に実証されており、そしてこれらはインビトロならびに臨床設定において、充分に実証された細胞傷害特性を有する(Rawinskyら, 1990; Nicoletiら, 1993; Rose, 1993; Verweijら, 1994; Rawinskyら, 1993; Brownら, 1991; Holmesら, 1991; Seidmanら, 1995; Chevallierら, 1994)。

非経口投与は、全身性悪性疾患の治療としてのタキサンアナログの好ましいアプローチである。不幸にも、これらの薬物のほとんどは、脈管内投与に適合するほとんどの生理学的に受容可能な水性溶媒において非常に低い溶解度を有する。市販のパクリタキセル処方物についての溶媒系は、深刻な副作用の可能性をもたらす、エチルアルコールおよびポリオキシエチル化ヒマシ油の組合せに基づく。この「標準的な」ビヒクルにおけるパクリタキセルは、一次アナフィラキシー様の性質の急性の副作用を有することが証明されており、ジフェンヒドラミン、ヒスタミンH<sub>2</sub>アンタゴニスト、およびさらにコルチコステロイドの大量の前投薬を必要としている(Weissら, 1990; TAXOL®(Paclitaxel))。本明細書中に開示される処方物は、共溶解性の原理(SpiegelおよびNoseworthy, 1963; YalkowskyおよびRoseman, 1981)に基づいており、パクリタキセルのようなタキサンアナログをそれらの細胞傷害特性に影響を及ぼさずに可溶化する能力を実証する。

好ましい溶媒は、利用される提案された濃度および総用量での実験動物およびヒトにおける投与のために実質的に非中毒性であり、そして安全であると証明される。実際に、DMSOは、ヒトに投与される種々の薬理学的に活性な薬剤の可溶化のために以前に用いられている(U.S. Department of Health and Human Services, 1984; Weissら, 1962; Kim, 1988)。PEGの非経口投与は、サルモデルにおいて詳細に研究されており(Lockardら, 1979)、そしてPEGはまた臨床的に、リンパ性白血病およびリンパ腫の処置においてL-Asparaginaseの(共有結合した)キャリアとして用いられている(Keatingら, 1993)。DMSOは、臨床医学において大量に使用されており、高用量の化学療法および造血性幹細胞移植の前の骨髄および末梢血前駆細胞の凍結保存のための凍結防止剤として最も広範に利用され

る (DavisおよびRowley, 1990; Gorin, 1992)。これらの希釈剤の使用による深刻な臨床的に有害な作用は体験されていない。通常生理食塩水 (NS)、水中のデキストロース (5 ~ 70%)、および水性脂質乳濁液の臨床使用は、液体および電解質バランスを正すため、ならびに非経口栄養物を供給するための、充分に確立された日常的な手段である。通常生理食塩水および水中のデキストランは、種々の薬物を非経口使用のために希釈するのに大量に使用されている。水性脂質乳濁液は薬学的希釈剤としての広範な使用を未だに見出していないが、この使用は示唆されている (Fortnerら, 1975)。齧歯類モデルにおいて得られたデータは、提案された安定なタキサン処方事が、全身性悪性疾患の非経口処置を可能にし、そして患者をエチルアルコールおよびCremophor<sup>®</sup>ELに曝露することなく、薬物の100%の生物学的利用能を提供することを実証する。パクリタキセルの短いiv注入の後、血漿濃度は、ヒト悪性細胞株に対する細胞傷害活性のインビトロ試験により確立されたように、抗新生物性の範囲に明らかに到達し、そしてその範囲に長時間とどまる。特に、本明細書中に開示されるパクリタキセル使用処方物は、RTで1週間を越えて化学的に安定であり、取扱いが簡単であり、そして信頼できかつ容易に制御される投与を、薬物の100%生物学的利用能で提供する。

要約すると、本知見により、長期間のパクリタキセルの投与を可能にすることによって、特定の悪性疾患（例えば、卵巣ガン、乳ガン、および免疫無防備状態の患者におけるカボージ肉腫）の処置において使用される方法および処方物の改善が提供される。これらの方法および処方物は、親油性薬剤の調製におけるアルコールおよび／またはポリオキシル化ヒマシ油の使用に関連する副作用の危険性を排除するというさらなる利点を提供する。

以下の実施例は、本発明の好ましい実施態様を実証するために含まれる。以下の実施例に開示される技術は、本発明の実施において良好に作用すると本発明者らにより見出された技術を代表し、従ってその実施のための好ましい態様を構成すると考えられ得ることが、当業者には認識されるはずである。しかし、当業者は、本開示を考慮して、本発明の精神および範囲から逸脱せずに、開示された特定の実施態様に多くの変更を行い得、そして依然として同様または類似の結果を得うることを認識するべきである。

## 実施例 1

## 非経口投与に受容可能なタキサンアナログ処方物

## 所望の溶解度の計算

パクリタキセルの適切な溶解度の範囲は、有意な抗腫瘍効力をヒトで有することが知られている用量からの推定により計算されている。これらの研究は全て、FDAに承認された現在唯一の非経口処方物である、エチルアルコール／Cremophor®EL調製物を用いて実施されている。現在利用されるパクリタキセル差生法は、代表的には、 $135\sim250\text{mg}/\text{m}^2$  体表面の範囲の用量を投薬する (Verweijら, 1994; Rawinskyら, 1993; Brownら, 1991; Holmesら, 1991; Seidmanら, 1995; TAXOL®(Paclitaxel))。パクリタキセルの臨床的に最も効率的な投与態様は、未だに知られていない。しかし、長期の注入態様では、薬物の神経性副作用が短時間（3時間）の注入で経験される副作用ほど著しくないことは明らかである。それゆえ、パクリタキセルの臨床的に最も最適な投与態様は、おそらく24時間より長い時間にわたる長期の注入であると仮定され、便利な取扱いを可能にするように、RTで少なくとも36~48時間の所望の安定性を有する使用処方物を必要とする。このような用量が $1\text{mg}/\text{mL}\sim5\text{mg}/\text{mL}$ の濃度で溶解される場合、少なくとも $10\text{mg}/\text{mL}\sim25\text{mg}/\text{mL}$ のストック処方物は、注入物中の薬物の物理的または化学的分解に起因する注入液の反復交換を必要とせず、必要とされる長期の時間間隔にわたって容易に注入され得るように、かなり広範囲の使用濃度の希釈で適切な取扱いを可能にするために好ましい。

## 生理学的に受容可能な溶媒における増強された溶解度

パクリタキセルの溶解度を、数種の個々のビヒクルにおいて決定した。粉末（精製薬物の2つの異なるアリコートを、Xechem Inc, New Brunswick, New Jerseyから得た）としての既知量の薬物を、それぞれの溶媒中で、RT (22°C) にて1時間にわたって平衡化した。次いで、アリコートを取り出し、そしてHPLCの前に所定の時間で、MeOH中に希釈した。これらの特定のビヒクルにおけるパクリタキセル溶解度に基づいて、次いで、共溶解性の原理 (SpiegelおよびNoseworthy, 1963; YalkowskyおよびRoseman, 1981) に従って異なる溶媒を混合することによ

り、(安定な) 溶解度を増強することを試みた。臨床的に適切な安定なストック処方物に到達するために、異なる溶媒系を、上記の必要な溶解度の見積もりに比較して評価した。次いで、このストック処方物を、「最終溶媒」で希釈して、非経口的に注入され得る、1~5 mg/mlの完全に安定な臨床的作業処方物を得る。最終溶媒を、通常に利用されている非経口注入液(NS、水中の5%デキストロース、または非経口で受容可能な水性脂質乳濁液(例えば、Intralipid) )の1つから選択した。これらの全では容易に利用可能であり、そして非経口投与のために承認されている。

#### HPLCアッセイ

溶液(タンパク質含有混合液および無タンパク質混合液の両方)中の低濃度のパクリタキセルの最も正確かつ敏感な検出系は、227nmでのUVスペクトルで操作する検出器の吸光度検出を利用する、HPLCアッセイである。227nmという値は、パクリタキセル分子の固有吸収極大に基づいて選択した。この一般的なアプローチは、何人かの研究者により以前に記載されている(Rizzoら, 1990; Willeyら, 1993; Sharmaら, 1994; Eisemanら, 1994)。

LDC 4000多溶媒送達系(multi-solvent delivery system)<sup>TM</sup>およびWaterシステム717plus Autoinjector<sup>TM</sup>を備えた液体クロマトグラフィー系を用いた。吸光度検出器は、LDCモデルCI 4100完全コンピューター化インテグレーターと連動したLDC 3100変動波長検出器であった。用いたカラムは、最初はWaters μ Bondapak<sup>TM</sup>フェニルカラム(3.9×300mm)であり、そして後にはWaters CiSymmetry<sup>TM</sup>カラム(3.9×150mm)(Millipore Corp., Marlborough, MA)を用いた。イソクラティック(isocratic)移動相系は、NH<sub>4</sub>-アセテート(20mM, pH5.0)/アセトニトリル/MeOH(50:40:10の容積比)から成っていた。全ての化学物質は、他に示さない限り、HPLCグレードであった。流速は1.0ml/分であり、そして記録計のチャート速度は5 mm/分であった。分析系を(Rizzoら, 1990; Willeyら, 1993; Sharmaら, 1994; Eisemanら, 1994; 未公開方法: Xechem Inc., Newark, New Jerseyの好意、および未公開方法, T. Madden博士, Department of Pediatrics, U

T MD Anderson Cancer Centerの好意)から確立した。

クロマトグラムにおける内在性血漿（タンパク質）ピークの出現は、薬理学試験におけるHPLC溶出との干渉を生じた。それゆえ、抽出／精製工程を、使い捨て用のSep Pak Vac 1 cc tC<sub>2</sub>抽出カラム (Waters Corporation Inc., Milford, MA) を用いて追加した。これらの使い捨て用の抽出カラムを、500 $\mu$ lのMeOH:水(85:15, v/v)を移動相として、1mlのMeOHおよび1mlの水で条件付けした。次いで、溶出液を、上記のようにHPLCにより分析した。

#### パクリタキセル溶解度

数種のストラテジーを、ヒトの投与に適合する、水混和性で生理学的に受容可能なビクリル中にパクリタキセルを可溶化するために評価した。調べた候補溶媒は、水性溶媒NS、水中の5%デキストロース、および水性大豆脂質乳濁液 (Intralipid) に加えて、DMA、DMSO、PEG、およびPGを含んでいた。DMAおよびDMSOは、最良の第1の溶媒であり、一方パクリタキセルは、予想されたように、ほとんどの水性溶媒に不溶性であった（表1）。DMAおよびDMSOでのみ、10mg/mlを越える溶解度に到達した。実際に、これらの溶媒の両方は、100mg/mlを越えるパクリタキセル濃度を得、そしてこの薬物は溶液中でRTにて4時間にわたって安定なままであった。しかし、パクリタキセルはDMAおよびDMSOに少なくとも100mg/mlまで溶解し得るが、この薬物は約12時間以内に溶媒中で分解し始めた。DMSOはおそらくタキサンと化学的に反応し得るという懸念に起因して、ほとんどの研究は、共溶解性アプローチを用いて、DMA中に溶解したパクリタキセルをどのようにして安定化するかということに取り組んでいた（SpiegelおよびNoseworthy, 1963; YalkowskyおよびRoseman, 1981）。数種の共溶媒の組合せを研究した；PEGの添加は、25mg/mlの安定な溶液を可能にし（図1および図2）、そしてこのストック溶液を1mg/mlまたは5mg/mlまで水性脂質乳濁液でさらに希釈した場合、得られる「使用处方物」は、RTで少なくとも7日間安定であった（図3を参照のこと）。

#### HPLCアッセイ

HPLCアッセイからの信頼性のあるパクリタキセルクロマトグラムの1例を図4

および図5に示す。このパネルにおいて、水性DMA/PEG/脂質「使用」溶媒中の薬

物を用いる安定性試験から薬物を分析した。 $\mu$ Bondapakフェニルカラムを利用する上記の条件下での保持時間は、約17~18分であった。別のアプローチを比較した後に、 $\mu$ Bondapakフェニルカラムを、同一の回収率および感度データを与えるが、より良好な分解能およびほんの10.3~11.3分の範囲の保持時間有するC<sub>18</sub>Symmetryカラムと交換した。アッセイは無タンパク質溶液（すなわち、処方物実行可能性試験および処方物安定性試験において利用される種々の溶媒系）において10ng/ml~50.0 $\mu$ g/mlの直線状であった。このアッセイは、一貫して高い回収率、正確度、および約5ng/mlのより低い感度限界を得た。この技術は、標準化され、そして変更を加えずに全ての安定性試験のために使用された。薬理学試験のために、クロマトグラムにおける内在性血漿タンパク質ピークの出現は、抽出／精製工程の追加を必要とした。この抽出を、Waters Sep Pak Vac 1cc tC<sub>2</sub>抽出カラムで達成した。血漿分析の結果については、実施例3を参照のこと。

#### 実施例2

##### インビトロでの安定性および他の特性、好ましい処方物

###### 溶解度試験

粉末としての過剰なバクリタキセルを、DMA、DMSO、PEG、およびPGにRTで添加した。各混合物を暗い環境におき、そして可溶化の証拠について1時間まで肉眼でチェックした。1mlのサンプルを種々の間隔で採取し、そしてシリニアセンブリー (Whatman Inc., Clifton, NJ) に取り付けた0.45 $\mu$ m PTFE<sup>TM</sup>メンブレンフィルター (Autovial<sup>®</sup>) を通して濾過し、そして適切な希釈の後に、バクリタキセル濃度をHPLCにより決定した。

###### 種々のバクリタキセル処方物の安定度

種々の非経口処方物の物理的および化学的安定性を試験するために、3セットの試験を行った：

(a)バクリタキセルを100mg/mlの濃度でDMAのみ（「一次ストック溶液」）の中に溶解し、そして4℃、22℃、40℃、および60℃でインキュベートした。可溶化

の直後に採取したサンプル中および徐々に時間間隔を48時間まで増加させた後に採取したサンプル中のバクリタキセル濃度を、HPLCにより決定した。

(b)DMA-バクリタキセル混合物を、PEG (1:3, v/v, DMA/PEG) または脂質乳濁液 (1:10または1:100, v:v, DMA:Intralipid) で希釈して10~25mg/mlの範囲の薬物ストック濃度を得た。

(c)DMA-バクリタキセル混合物を、通常生理食塩水または水中の5%デキストロース中に希釈して、1mg/mlおよび5mg/mlの薬物濃度を得た。

種々の処方物を、それぞれの溶媒系における分解の初期速度に依存して、混合の直後、次いで1時間毎に8時間、次いで時間間隔を徐々に増加させながら10日間より長く、HPLCにより分析した。

薬物の溶解度は、異なる一次溶媒の間で著しく異なった。DMAおよびDMSOのみが、100mg/mlを越える溶解度を提供し、そして上記のように、一次溶媒としての長期の試験のためにはDMAが好ましかった。

最終使用処方物におけるDMA濃度を低下させるため、および薬物の貯蔵寿命を改善するために、PEGを共溶媒として研究した。PEGの使用は、25mg/ml程度の高い薬物「ストック」濃度でさえも、薬物の沈殿または迅速な化学的分解を伴わず、水性ビヒクル中でその後の希釈を可能にすることを予想させた。さらに、完全溶媒系におけるDMA濃度全体が低いことは、より高濃度のDMAまたはDMSOが一次可溶化工程に使用された場合よりも低い、最終使用処方物の溶血潜在能力を得ることを予想させた。

#### 浸透圧測定

浸透圧を、マイクロオスモーメーターモデル3moplusオスモーメーター (Advanced Instruments Inc., Needham Heights, MA) で測定した。器具を、500~2000mOs m/kgの範囲にわたって、Advans™ 固有較正スタンダード (Advanced Instruments Inc.) を用いて較正した。試験溶液を、試験キットからの使い捨て用のキュベットに入れ、そして浸透圧の読み取り値をmOsm/kgの単位で平衡化した後に記録した。3連の測定を、各ビヒクル (バクリタキセルなし) について実施し、そして6回の測定を、バクリタキセルの添加ありで行なった。

両側t検定を用いて、バクリタキセルの添加ありおよびなしでの種々のビヒクル処方物の浸透圧の差を評価した (MannおよびWhitney, 1947)。2群の平均値

の間の差は、 $P \leq 0.05$ で有意差ありと判断された。

#### インピトロでの溶血試験

Parthasarathyらの手順を用いて、いくつかの選択された調製物の溶血潜在能力を調べ、そして最も最適な処方物のLD<sub>50</sub>値を、記載された (Parthasarathyら, 1994) 通りに作製した。ヘパリン処理血液を、等容積のAlsever溶液と混合した。この混合液をPBS中で2回洗浄し、次いで10% (v/v) 赤血球/PBS溶液を調製し、そしてパクリタキセルの添加ありまたはなしの漸増量の完全溶媒系と混合した。次いで、これらの混合物を、37℃にて4時間インキュベートした。インキュベーションの最後に、Eppendorf微量遠心管中で10,000×gで細胞をペレット化し、そして上清中のヘモグロビンの放出（すなわち、溶血）を分光光度計で550nmで決定した。最大溶解を、低張ショックにより完全に溶解してある赤血球の参照溶液に対して測定した。「最適な」完全な処方物の溶血潜在能力を、記載された (Parthasarathyら, 1994) ように評価し、そしてデータを、健常細胞画分対In (総容積パーセント) としてプロットした。総容積パーセントを、血液で希釈した後の混合物中のビヒクルの容積パーセントとして定義した。このことを、非経口投与後の血流中のそれぞれの薬物処方物の希釈をシミュレーションするために行なった。健常な赤血球を、パクリタキセルありまたはなしの溶媒ビヒクルとの混合後にそれらのヘモグロビンを細胞内に保持し得る赤血球として定義した (Parthasarathyら, 1994)。

#### パクリタキセルのインピトロ細胞傷害性

パクリタキセルありおよびなしの選択された溶媒系の細胞傷害性潜在能力を、2つのヒト骨髄性白血病細胞株HL-60 (Gallagherら, 1979) およびKBM-7/B5 (Anderssonら, 1987; Anderssonら, 1995) に対して、以前に公開された細胞傷害性アッセイである「MTT」アッセイ (Hansenら, 1989; Anderssonら, 1995) を用いて、および試験管内腫瘍細胞感受性試験 (Anderssonら, 1994) を用いて決定し

た。10%ウシ胎児血清を補充したIscoveの改変Dulbecco培地(CIMDM)中のHL-60またはKBM-7/B5細胞を、37℃にて60分間インキュベートした。24時間後、25μl MTT溶液 (5mg/ml) (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) を各サンプルに添加し、

続いてさらに37℃にて2時間インキュベートし、 $100\mu\text{l}$ の抽出緩衝液を添加した[抽出緩衝液:DMFおよび脱イオン水(1:1)の溶液中に37℃で飽和するまで溶解した20% (w/v) SDS; (pH4.7)]。37℃にて一晩のインキュベーション後に、光学密度を、較正プランクとしての抽出緩衝液に対してTiter-Tech™ 96ウェルマルチスキャナー(96-well multi-scanner)™を用いて570nmで測定した。細胞傷害性を、上記のように溶媒土バクリタキセルに曝露したサンプルと、PBS単独で平行にインキュベートした細胞のバックグラウンド反応性との間の比色の差違として決定した。全ての決定を、3連で行った。あるいは、60分間のインキュベーション後、細胞を氷冷PBS(pH7.4)中で洗浄し、そして20%ウシ胎児血清および粘性支持体としての0.3%寒天を有するIMDM中に再懸濁した。37℃にて7日間のインキュベーション後、>50細胞のクローニングを倒立位相差顕微鏡の下で計数し、そして生存曲線を記載された(Anderssonら、1994)ように構築した。

#### 平衡溶解度決定

>100mg/mlのバクリタキセルの最大平衡溶解度を、RTにて1時間以内に、DMAおよびDMSOにおいて達成した。それぞれ、PEG-400、PG、NS、Intralipid、および5%デキストロースを利用する溶解度試行は、有意な濃度の可溶化薬物を全く生じなかった(表1)。それゆえ、後者は、一次溶媒としての試験についてさらには考慮しなかった。DMAおよびDMSOの両方において、バクリタキセルは、RTにて少なくとも4時間は完全に安定であったが、DMSOの硫黄基がRTでの長期の曝露に際してタキサン構造と反応性であり得ることが予想される。それゆえ、無水DMAは、一次溶媒として好ましい。DMA中に>100mg/mlのバクリタキセル溶解度に到達した場合、薬物は、RTにて一晩の保存の後にゆっくりと分解し始めた。薬剤を安定化するために、いくつかの共溶媒を調べた。PEGをDMAと組み合わせて使用した場合、4℃およびRTでの実際の生存安定性試験は4.5ヶ月を越える期間にわたって、識別可能な分解を生じなかった(図1)。

#### 種々の処方物の安定性試験

異なる溶媒処方物中の可溶化バクリタキセルの温度依存性安定性を、以下通りに試験した: 薬物を、DMA中に100mg/mlで、そしてPEG(1:3, v/v)の添加後、

25mg/mlの最終パクリタキセル濃度まで溶解した。異なるアリコートを、4℃、22℃、40℃、および60℃にて保存した(図2)。可溶化の直後および50日間を越えるまで種々の間隔で、異なるサンプルからのアリコートをHPLCにより分析した。4℃、RT、および40℃にて保存した薬物サンプルは、観察の最初の60日間にわたって有意な分解を全く示さなかった。60℃では、観察の最初の6時間において約10~15%の喪失が存在し、その後、6週間を越える期間にわたってさらなる分解は存在しないようであった。この知見は、薬物がまた、このストック処方物中で上昇した温度において安定であることを示唆する。

次いで、N5または水中の5%デキストロースを最終溶媒として用いた場合、有意な分解が4~6時間以内で生じた。対照的に、水性脂質乳濁液を最終的な溶媒ビヒクルとして用いた場合、得られた溶液は1mg/mlおよび5mg/mlで、4℃およびRTにて1週間にわたって安定であった(図3を参照のこと)。

#### 浸透圧

薬理学的に活性な薬剤の非経口処方物が、血液に対して等張であることが望ましい。高張性送達系は、薬物/溶媒が(中央)静脈カテーテルを通して注入され、そして大きな血液容積中に徐々に希釈される場合、利用され得る。現在の処方物の1つの浸透圧を表2に示す。パクリタキセルありまたはなしの一次DMA/PEGストック調製物(formula)は、非常に高張であった;その浸透圧は、ヒトの血液についての280~295mOsm/Kgと比較して、4,000mOsm/kgを越えると評価された。対照的に、Intralipidを有するDMA/PEG/パクリタキセルの混合物は、等張に近かった。この完全ビヒクルの浸透圧は、1mg/ml(<5%)のパクリタキセルの添加によって、認め得る程には変化しなかった。

#### 溶血

図6に示すように、使用処方物は、完全ビヒクルをパクリタキセルの添加ありまたはなしのいずれかで用いた場合、溶血を誘導する低い能力を示した。パクリタキセル依存性溶解は、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ までおよびそれを越える薬物濃度について、バックグラウンドよりも上であるとかろうじて知覚され得た。タキサン特異的溶血は、異なる試験間で高度に再現性であった。パクリタキセルありおよびなしで

完全な使用ビヒクルを用いる異なる試験からの詳細を、図6にまとめる。DMA/PE G/Intralipid<sup>®</sup> 処方物は、非常に低い溶血潜在能力を有していた。

#### パクリタキセルのインピトロ細胞傷害性

HL-60およびKBM-7/B7骨髄細胞を、漸増薬物濃度の添加ありまたはなしで、漸増容積比でDMA/PEG/Intralipidの最終使用ビヒクル中のパクリタキセルに、およびポジティブコントロールとしてのCremophor<sup>®</sup>EL/エチルアルコール処方物中のパクリタキセルに曝露した。これらの溶媒系のいずれも、MTTでのこれらの試験または試験管内腫瘍細胞感受性試験において用いた細胞株に対して、単独では検出可能な中毒性を全く有さなかった。パクリタキセルをそれぞれの溶媒系に添加した場合、濃度依存性細胞傷害性が、両方の処方物について観察された（試験管内腫瘍細胞感受性試験で得られたデータについては図7を参照のこと；類似の確証的なデータが、MTTアッセイで得られた）。薬物は、標準的な処方物と比較して少なくとも等価な細胞傷害性潜在能力を、調べた新規な処方物において保持したようである。

#### 実施例3

##### 血漿中での定量的パクリタキセル分析およびivパクリタキセルの薬理学 血漿中のパクリタキセルの定量的抽出

ラット血漿 ( $500\mu\text{l}$ ) を、(最終容積の<3%で) 種々の量のパクリタキセルと混合して、(5 mg/mlの薬物濃度のDMA/PEG/Intralipid中のパクリタキセルストック使用溶液から) 0.05~3.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の薬物濃度を得た。薬物を、上記のように血漿サンプルから抽出した。 $500\mu\text{l}$  の血漿を、1 ml MeOHで、次いで1 ml水で

予め条件付けしたSep Pak Vac 1 cc to tC2カートリッジ上にロードした。続いて、サンプルを1 mlの水で洗浄し、続いて1 ml MeOH:水 (1:3, v/v) で洗浄し、次いで500  $\mu\text{l}$  MeOH:水 (85:15, v/v) で溶出した。溶出液を、上記のようにHPLC分析に供し、そしてパクリタキセルを分光光度計により227 nmで検出した。 $10\mu\text{g}/\text{ml}$  の薬物濃度までスパイクしたラット血漿からのパクリタキセルの回収率は、 $87 \pm 3\%$  であると計算された。アッセイは、10 ng/ml~50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の間では直線状であり、検出限界は5 ng/mlであった。

### ラットにおける非経ロバクリタキセル

インビポでの試験のために、250~300gの体重の雄性Sprague-Dawleyラットを用いた。これらは、Harlan-Sprague-Dawley地方交配施設 (local breeding facility) , Houston, Texasから購入した。動物を、MD Anderson Cancer Centerへの輸送の後に最小3~4日間、環境の変化に適応させた。全ての動物を、薬理学的試験の前およびその間、市販の飼料および水道水に自由に接近させた。3mg/kgの用量を、薬理学的前投薬の非存在下で致死的なアナフィラキシー様反応を伴わずに、Cremophor<sup>®</sup>ELに基づく調製物の緩徐なiv注射でラットに与えられ得る最大用量として決定した。5mg/kg体重および10mg/kg体重の試行注射により、Cremophor<sup>®</sup>ELに基づく調製物を用いた場合はアナフィラキシーによる突然死となったが、開示された処方が用いられた場合はそうならなかった。

インビポ薬理学試験のために、バクリタキセルを、25mg/mlのストック薬物濃度までDMA/PEG中に処方し、次いでIntralipidで希釈したので、用量 (3.0mg/kg) が尾静脈を通しての注射により、0.5mlの最大容積でiv投与され得た。市販のバクリタキセル調製物 (TAXOL<sup>®</sup> (Paclitaxel) ) についての製造者の推奨に反して、薬理学的前投薬を、本試験の動物には用いなかった。このことは、薬物代謝／除去を変更し得、そして（より後の部分の）血漿濃度曲線に影響を与える得る、ミクロソーム肝臓酵素の誘導の可能な影響を回避した。同じ理由のため、全ての動物に麻酔をせず、そして薬物注射の間、単に物理的に拘束した。注射した使用処方物の薬物濃度は、使用前にHPLCにより確認された。バクリタキセル血漿濃度の決定のために、薬物注入の前（ランク血漿のため）および注射の5分~24時間

間後の選択された時点で、軽いCO<sub>2</sub>麻酔下で心臓穿刺を通してヘパリン処理チューブ中に0.5~1.0mlの血液サンプルを採血した。血液を1,000×gで10分間遠心分離し、そして血漿を分離し、そして上記のように抽出しそしてHPLCによりアッセイするまでは、-80°Cで保存した。

### 血漿中のバクリタキセルおよびiv薬物薬理学

Sep Pak Vac 1 cc tC<sub>2</sub>カラムを用いてのMeOHでの血漿からの薬物抽出は、内在性血漿成分からの干渉を回避するため、および最大量の薬物を回収するために必

須であった。ブランク血漿、バクリタキセルスパイク血漿からの信頼性のあるクロマトグラム、および現在の薬物動態試験からの血漿サンプルの抽出後に得られたクロマトグラムの1例を、図8に示す。この系におけるバクリタキセル保持時間は、10.3~11.3分であった。上記の技術でのバクリタキセルの回収率は、ラット血漿がインピトロで $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の薬物でスパイクされた場合、87±3%であった。アッセイは、血漿サンプルからの薬物抽出後に、 $10\text{ng}/\text{ml}$ ~ $50\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲で直線状であった。限界感度は、 $200\mu\text{l}$ がクロマトグラムに注射された場合は約 $5\text{ng}/\text{ml}$ であった。この感度は、より大きな部分の $2\text{ml}$ 注射ループの系を利用し、そしてまた $500\mu\text{l}$ の溶出液を小容積中にエバポレート／再構成することにより改善され得ることが予想される。標準曲線は、薬理学試験については $10\text{ng}/\text{ml}$ ~ $1,000\text{ng}/\text{ml}$ の濃度範囲で作製され、そして血漿バクリタキセル濃度とビーカAUC値との間に良好な相関が得られた。

データは、新規なバクリタキセル処方物が、 $3\text{mg}/\text{kg}$ 体重の市販の調製物の同一用量の注射の後に得られた血漿濃度と少なくとも等価な血漿濃度を与えることを例示する（図9）。

全体として考慮して、本実施例は、バクリタキセルをプロトタイプ化合物として用いて、薬学的に受容可能な、安定なタキサンアナログ処方物の首尾良い設計を実証する。最適の溶媒系は、齧歯類モデルにおいて示したように、良好な寛容性および無視できる急性溶媒系中毒性で、脈管内投与に生理学的に適合性である。ラットにおける調製物の1つの脈管内注射（ $200\text{mg}/\text{m}^2$  体表面積と同様に $3.0\text{mg}/\text{kg}$ ）は、バクリタキセルの細胞傷害性濃度に達し、そして何時間にもわたってそ

の濃度で維持された血漿濃度を生じた。この試験のために、使用処方物のためにIntralipidを「最終」溶媒として有する、DMAとPEGとの1:3混合物の処方物を使用したこと留意すべきである。

好ましい最終使用処方物、DMA/PE/Intralipidで得られたデータは、結論的に、細胞傷害活性の予測可能な達成および溶媒ビヒクルからの低いかまたは無視できる正常器官中毒性の合理的な見込みで、悪性疾患の臨床治療においてこの非経

口タキサン（パクリタキセル）処方物を導入することの実現可能性を実証する。

特

に、大量のiv Cremophor<sup>®</sup>ELおよびエチルアルコールの使用と少なくとも部分的には関連付けられ得る、生命を危険にさらす深刻な過敏性反応の可能性は、ここで完全に回避され得る。これらの新規な溶媒系は、溶媒系中毒性の危険性を劇的に低減するだけでなく、タキサンアナログ（例えば、パクリタキセル）に関連する臨床的に有害な作用を有機溶媒が増強し得る危険性を最小にし、そして便利な取扱いおよび長期の投与スケジュールの正確な評価を可能にすることが予想される。

#### 要旨

脈管内投与のための親油性タキサンアナログ（例えば、パクリタキセル）の安定で薬学的に受容可能な処方物のための新規なビヒクルが発明された。敏感かつ特異的なHPLCアッセイを開発し、これが、10~50ng/ml程度の低いパクリタキセル濃度の再現可能な定量を可能にした。平行して、その脈管内投与の後に得られた血漿サンプルからパクリタキセルを再現可能に回収するための抽出技術を開発した。その後、新規に処方された非経口の適合可能なビヒクルの安定性試験を、溶血潜在能力の試験およびインピトロでの細胞傷害活性のために最良の処方物を選択するために開始した。続いて、安定な新規の処方物の1つを、ラットにおいて3.0mg/kg体重で非経口的に注入した。示した結果から、ラットモデルにおける新規な調製物のiv注射の後に高い薬物濃度が得られ得ることが明らかである。さらに、この調製物は、細胞傷害性の範囲にあることが明らかである、血漿薬物濃度および血漿濃度対時間曲線の下の面積を生じた。タキサン（例えば、パクリタキセル）を含有する、これらの最も安定な低中毒性のビヒクルを、転移性ガンの

非経口処置について試験することが現在可能であるはずである。最終的に、悪性疾患に対するパクリタキセルおよび他のタキサンアナログの効力の臨床試験が実施される。

表1  
種々の溶媒におけるパクリタキセルの溶解度

溶媒	実験数	溶解度、mg/ml
DMA	3	>200
DMSO	1	>100
プロピレン glycol	1	不溶性*
PEG	1	不溶性
通常生理食塩水	1	不溶性
5%デキストロース	1	不溶性
Intralipid™	1	不溶性

\*不溶性は、ここで、室温にて60分間後の<0.1mg/mlの溶解度と定義する

表2  
1つの新規なパクリタキセル処方物の浸透圧

溶液	n <sup>a</sup>	浸透圧、m0sm/kg (±S.D.)
<b>新規なストック処方物</b>		
DMA:PEG (1:3)	1	>4,000 <sup>b</sup>
<b>新規な使用処方物<sup>c</sup>、</b>		
ビヒクルのみ	3	568±7
<b>新規な使用処方物<sup>d</sup>、</b>		
パクリタキセルを有するビヒクル	3	592±10
水中の5%デキストロース	3	286±12
通常生理食塩水	3	233~238
血液	8	280~295
水	3	3

n<sup>a</sup>、独立した観察数

<sup>b</sup>、この実験値は、おそらくアーティファクトである；オスモメトリーは、凍結点下降を使用し、これは生理学的条件下での有機溶媒の物理的特性を正確に反映しないかもしれない

<sup>c</sup>、処方物は、本文中に記載されたDMA:PEG:Intralipid使用処方物であった

<sup>d</sup>、処方物は、上記の使用処方物であった、パクリタキセル濃度1.0mg/ml

本発明の組成物および方法は、好ましい実施態様に関して記載されているが、本発明の概念、精神、および範囲から逸脱することなく、本明細書中に記載される組成物、方法、ならびに方法の工程または一連の工程に変更が適用され得ることは当業者には明らかである。当業者に明らかなこのような類似の置換および改変の全ては、添付の請求の範囲に規定されるように本発明の精神、範囲、および概念の範囲内であると判断される。

#### 参考文献

以下の参考文献は、これらが、本明細書中に示される詳細を補足する例示的手順の詳細または他の詳細を提供する程度に、特に本明細書中に参考として援用される。

Andersson BS, Beran M, Pathak S, Goodacre A, Barlogie B, McCredie KB, "Ph-Positive Chronic Leukemia with Near-Haploid Conversion *In Vivo* and Establishment of a Continuously Growing Cell Line with Similar Cytogenetic Pattern," *Cancer Genetics and Cytogenet*, 24:335-43, 1987.

Andersson BS, Collins VP, Kruzrock R, Larkin DW, Childs C, Ost A, Cork A, Trujillo JM, Beran M, Freireich EJ, Siciliano M and Deisseroth AB, "KBM-7; Human Myeloid Leukemia Cell Line with Double Philadelphia Chromosomes but Lacking Normal BCR and c-ABL Transcripts," *Leukemia*, 9:2100-2108, 1995.

Andersson BS, Mroue M, Britten RA, Murray D, "The Role of DNA Damage in the Resistance of Human Chronic Myeloid Leukemia Cells to Cyclophosphamide Analogs," *Cancer Research*, 54:5394-5400, 1994.

Andersson BS, Sadeghi T, Siciliano M, Legerski R, Murray D, "Nucleotide Excision Repair Genes as Determinants of Cellular Sensitivity to Cyclophosphamide Analogs," *Cancer Chemother and Pharmacol*, In Press, 1995.

Brown T, Havlin K, Weiss G, Cagnola J, Koeller J, Kuhn J, Rizzo J, Craig J, Phillips J, von Hoff D, "A Phase I Trial of Taxol Given by a 6-Hour Intravenous Infusion," *J. Clin. Oncology*, 9:1261-1267, 1991.

Chevallier B, Fumoleau P, Kerbrat P, Dieras V, Roche H, Krakowski I, Azli N, Bayssass M, Lentz MA, Van Glabbeke M, "Docetaxel is a Major Cytotoxic Drug for the Treatment of Advanced Breast Cancer: A Phase II Trial of the Clinical Screening

Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer," *J. Clin. Oncol.*, 13:314-322, 1994.

Davis JM and Rowley SD, "Autologous Bone Marrow Graft Processing. In: *Processing of Bone Marrow for Transplantation*, Sacher RA, McCarthy LJ, Smit Siblinga Cth, American Association of Blood Banks, Arlington, VA pp. 41-62, 1990.

Eiseman JL, Eddington ND, Leslie J, MacAuley C, Sentz DL, Zuhowski M, Kujawa JM, Young D, Egorin MJ, "Plasma Pharmacokinetics and Tissue Distribution of Paclitaxel in CD<sub>2</sub>F1 Mice," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 34:465-471, 1994.

Forster CL, Grove WR, Bowie D, Walker MD, "Fat Emulsion Vehicle for Intravenous Administration of an Aqueous Insoluble Drug," *Am. J. Hosp. Pharm.*, 32:582-84, 1975.

Gallagher R, Collins S, Trujillo J, McCredie KB, Ahern M, Tsai S, Anilakh GS, Ting R, Ruscetti F, Gallo R, "Characterization of the Continuously Differentiating Myeloid Cell Line (HL-60) from a Patient with Acute Promyelocytic Leukemia," *Blood*, 54:254-68, 1979.

Goria NC, "Cryopreservation and Storage of Stem Cells. In: *Bone Marrow and Stem Cell Processing: A Manual of Current Techniques*," Areman EM, Deeg JH, Sacher RA, pp. 292-362, 1992.

Hansen MB, Nielsen SE, Berg K, "Re-Examination and Further Development of a Precise and Rapid Dye Method for Measuring Cell Growth/Cell Kill," *J. Immunol. Methods*, 119:203-210, 1989.

Holmes FA, Walters RS, Theriault RL, Forrestan AD, Newton LK, Raber MN, Buzdar AU, Frye DK, Hortobagyi GN, "Phase II Trial of Taxol, An Active Drug in the

Treatment of Metastatic Breast Cancer," *J. National Cancer Institute*, 83:1797-1805, 1991.

Keating MJ, Holmes R, Lerner S, Ho DH, "L-Asparaginase and PEG Asparaginase-Past, Present and Future," *Leukemia and Lymphoma*, 10:153-57, 1993.

Kim SN, "Preclinical Toxicology and Pharmacology of Dimethylacetamide with Clinical Notes," *Drug Metab. Rev.*, 19:345-368, 1988.

Lockard JS, Levy RH, Congdon WC, DuChenne LL, "Efficacy and Toxicity of the Solvent Polyethylene Glycol 400 in Monkey Model," *Epilepsia*, 20:77-84, 1979.

Mann HB and Whitney DR, "On a Test Whether One of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other," *Ann. Math. Statist.*, 18:50-60, 1947. . . . .

Nicoletti MI, Lucchini V, Massazza G, Abbott, BJ, D'Inaciel M, and Giavazzi R, "Antitumor Activity of Taxol (NSC-125973) in Human Carcinomas Growing in the Peritoneal Cavity of Nude Mice," *Annals of Oncology*, 4:151-155, 1993.

Parthasarathy R, Sacks PG, Harris D, Brock H, Metha K, "Interaction of Liposome-Associated All-Trans-Retinoic Acid with Squamous Carcinoma Cells," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 34:527-34, 1994.

Rizzo J, Riley C, von Hoff D, "Analysis of Anticancer Drugs in Biological Fluids: Determination of Taxol with Application to Clinical Pharmacokinetics," *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 8:159-164, 1990.

Rose WC, "Taxol-Based Combination Chemotherapy and Other *In Vivo* Preclinical Antitumor Studies," *Monogr National Cancer Institute*, 15:47-53, 1993.

Rowinsky EK, Cazenave LA, Donehower RC, "Taxol: A Novel Investigational Antimicrotubule Agent," *J. National Cancer Institute*, 82:1247-1259, 1990.

Rowinsky EK, McGuire WP, Donehower RC. "The Current Status of Taxol. In: *Principles and Practice of Gynecologic*," Hoskins WJ, Perez CA, Young RC (Eds), *Oncology Updates*, J.B. Lippincott Company Philadelphia, PA, 1993.

Seidman AD, Reichman BS, Crown JPA, Yao T-J, Currie V, Hakes TB, Hudis CA, Gilewski TA, Baselga J, Forsythe P, Lepore J, Marks L, Fain K, Souhrada M, Onetto N, Arbuck S, Norton L, "Paclitaxel as Second and Subsequent Therapy for Metastatic Breast Cancer: Activity Independent of Prior Anthracycline Response," *J. Clin. Oncology*, 13:1152-1159, 1995.

Sharma A, Conway WD, Straubinger RM, "Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Taxol in Mouse Plasma," *J. Chromatography B*, 655:315-319, 1994.

Spiegel AJ, and Noseworthy MN, "Use of Nonaqueous Solvents in Parenteral Products," *J. Pharm. Sci.*, 52:917-927, 1963.

TAXOL® (Paclitaxel) for injection concentrate. Product insert label from Mead-Johnson, a subsidiary of Bristol Meyers Squibb, Inc.

U.S. Department of Health and Human Services: NCI Investigational Drugs. NIH Publication No. 84-2141, 1984.

Unpublished Method: Courtesy of Kechem Inc., Newark, New Jersey.

Verweij J, Clavel M, Chevalier B, "Paclitaxel (Taxol™) and docetaxel (Taxotere™) "Not Simply Two of a Kind," *Annals of Oncology*, 5:495-505, 1994.

Weiss AJ, Jackson LG, Carabasi RA, Mancall EL, White JC, "A Phase I Study of Dimethylacetamide," *Cancer Chemother. Rep.*, 16:477-85, 1962.

Weiss R, Donehower RC, Wiernick PH et al., "Hypersensitivity Reactions from Taxol," *J. Clin. Oncology*, 8:1263-1268, 1990.

Willey TA, Bekos EJ, Gaver RC, Duncan GF, Tay LK, Beijnen, Framaen RH, "High-Performance Liquid Chromatographic Procedure for the Quantitative Determination of Paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>) in Human Plasma," *J. Chromatography*, 621:231-238, 1993.

Yalkowsky SH and Roseman TJ, "Solubilization of Drugs by Cosolvents. In: *Techniques of Solubilization of Drugs*," Marcel Dekker Inc., New York, NY, pp. 91-134, 1981.

【図1】

室温 (22°C) および4°Cでのパクリタキセル安定性  
ストック処方物 (25mg/ml)

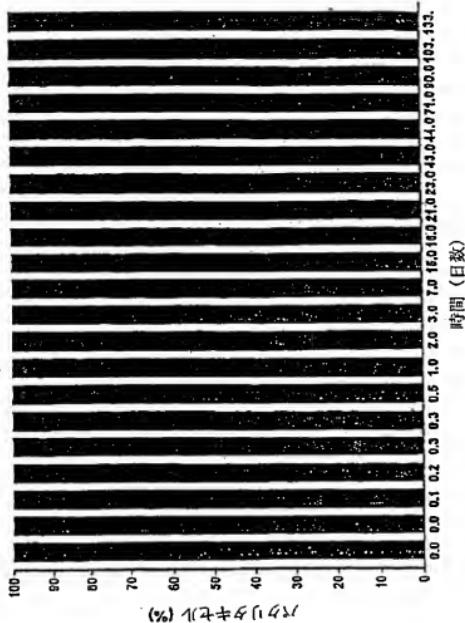


FIG. 1

【図2】

温度依存性安定性  
新規处方物

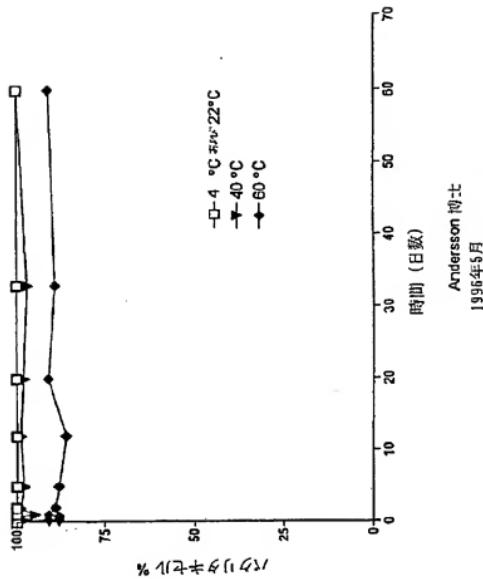


FIG. 2

【図3】

室温でのパクリタキセル安定性  
使用处方物

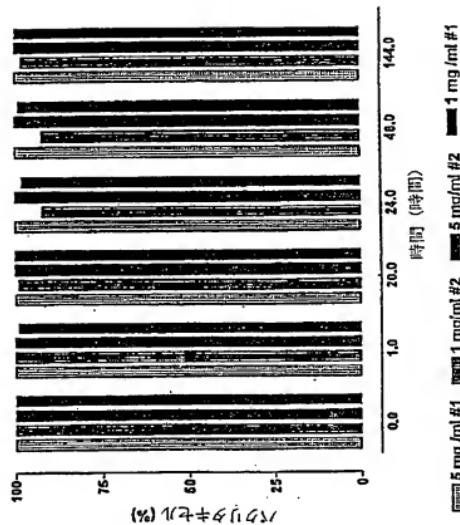


FIG. 3

【図4】

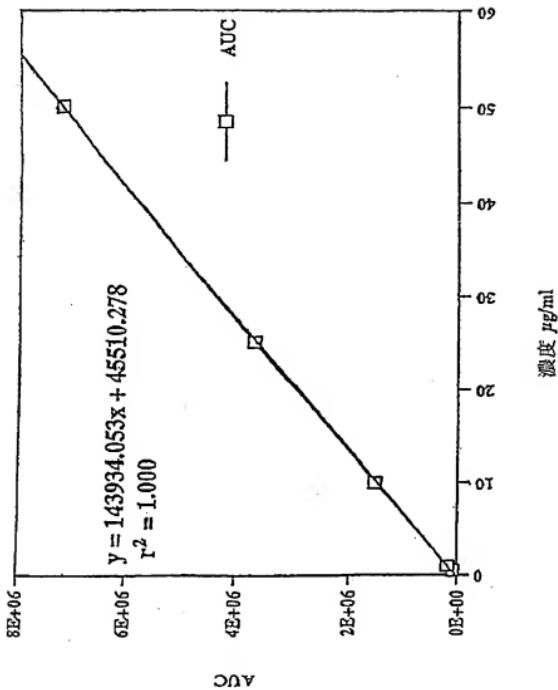
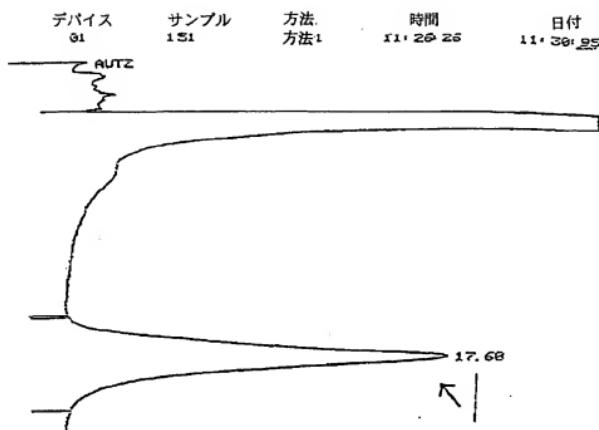


FIG. 4

【図5】



RUN 時間 22.00

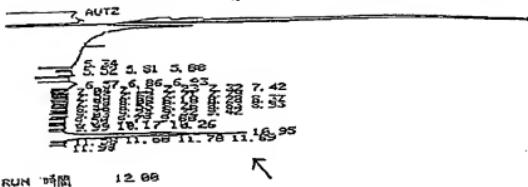
デフォルト 面積を用いる正規化方法			面積 %	PK 名
時間 17.68	151.6662	1.00.000000		
計	151.6662	100.000000		

FIG. 5A

[図 5]

FIG. 5B

サンパレ 方三郎 14:13:39 G4:G1:56  
427 方三郎

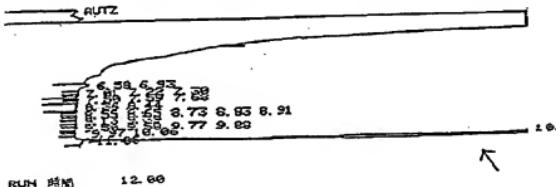


$\frac{7}{17} \times 10^{-4}$	8	正化成法
直接用 113		方法
1947		
5.61	1735	P 1.02225
6.57	4286	P 2.5277
18.95	162096	P 96.456
11	163667	160.00

PK 6

FIG. 5C

テレックス 428 方言 1 時間 84-61-96



下7天以上 商標化方法		時間	總量	單位%
6.55		6.55	6.23354917	
16.55		16.552666	99.76123588	
	計	1635941	100.0000000	

【図6】

溶血潜在能力

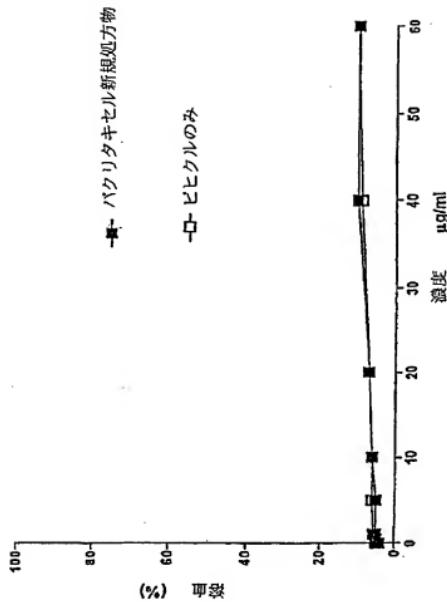


FIG. 6

【図7】

細胞傷害性；試験管内腫瘍細胞感受性試験

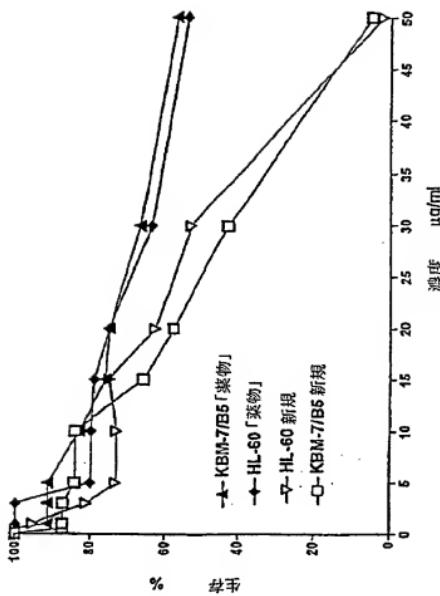


FIG. 7

[図8]

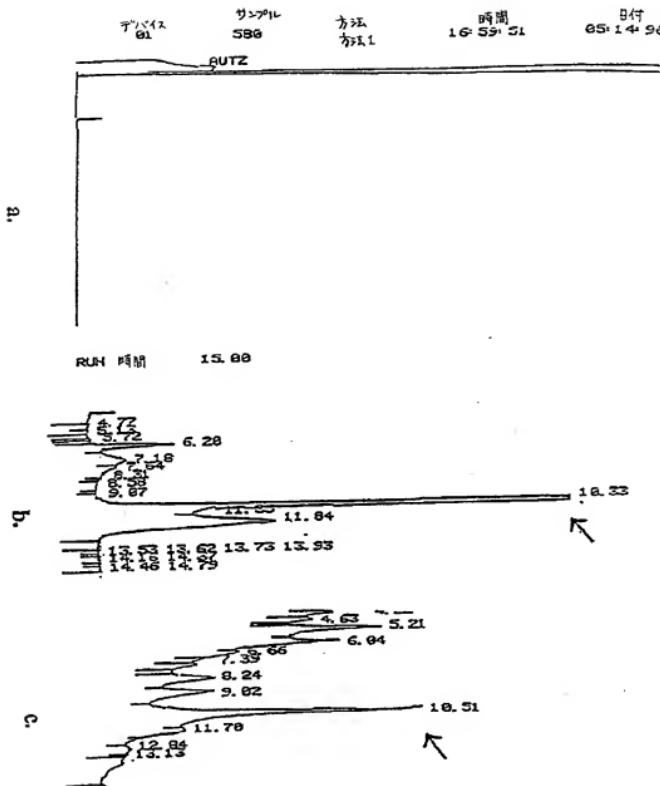


FIG. 8

【図9】

バクリタキセル血漿クリアランス

(41)

特表2000-515132

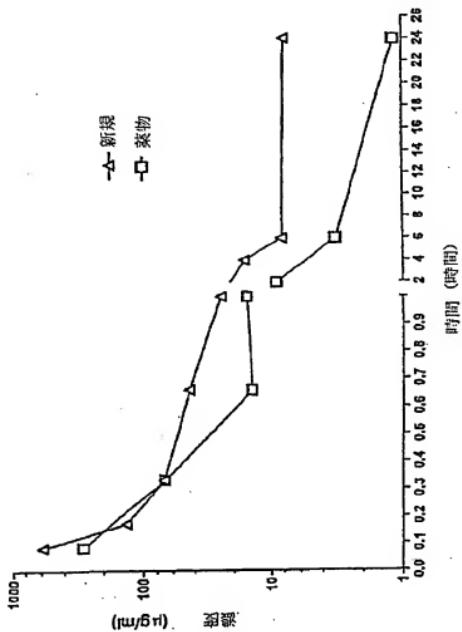


FIG. 9

## 【国际調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

	International application No. PCT/US97/11503
--	---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC(6) : A61K 31/353; C07D 305/14 US CL : 514/449; 549/510 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/449; 549/510		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAS ONLINE, APS search terms: paclitaxel, taxane, taxol, diamethylacetamide, DMA, polyethyleneglycol, PEG		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category <sup>a</sup>	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y, P	US 5,597,829 A (HAUSHEER ET AL) 28 January 1997, column 13; column 16, line 59 to column 18, line 38; column 19, lines 35-47.	1-14
Y	SPARREBOOM et al. Nonlinear pharmacokinetics of paclitaxel in mice results from the pharmaceutical vehicle Cremophor EL. Cancer Research. 01 May 1996, Vol. 56, pages 2112-2115, especially page 2114.	1-14
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<ul style="list-style-type: none"> <li>* Special categories of cited documents:</li> <li>'A' document disclosing the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</li> <li>'E' earlier document published on or after the international filing date</li> <li>'L' document which is either dated on priority claimed or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified)</li> <li>'O' document referring to an oral disclosure, ms. exhibition or other means</li> <li>'T' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>" later document published after the international filing date or priority date and not earlier than the publication date cited to understand the principle or theory underlying the invention</li> <li>" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</li> <li>" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken in combination with one or more other such documents, each combination being obvious to a person skilled in the art</li> <li>" document member of the same patent family</li> </ul>
Date of the actual completion of the international search <b>21 AUGUST 1997</b>		Date of mailing of the international search report <b>09 SEP 1997</b>
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Fax/phone No. (703) 305-2720		Authorized officer <b>EVELYN HUANG</b> Telephone No. (703) 305-1215

---

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,  
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L  
U, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF  
, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE,  
SN, TD, TG), AP(GH, KE, LS, MW, S  
D, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG  
, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT  
, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA,  
CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, F  
I, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE  
, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, M  
X, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE  
, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT,  
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成17年3月10日(2005.3.10)

【公表番号】特表2000-515132(P2000-515132A)

【公表日】平成12年11月14日(2000.11.14)

【出願番号】特願平10-504432

【国際特許分類第7版】

A 61 K 31/337

A 61 K 9/107

A 61 K 47/16

A 61 K 47/34

【F I】

A 61 K 31/337

A 61 K 9/107

A 61 K 47/16

A 61 K 47/34

【手続補正書】

【提出日】平成16年6月17日(2004.6.17)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】補正の内容のとおり

【補正方法】変更

【補正の内容】

手続補正書

平成16年6月17日

通

特許庁長官 殿

## 1. 事件の表示

平成10年特許願第504432号

## 2. 補正をする者

住所 アメリカ合衆国 テキサス 78701, オースティン, ウエスト  
7ディエイチ ストリート 201

名称 ボード オブ リージェンツ, ザ ユニバーシティ オブ テキサス  
システム

### 3. 代理人

住所 〒540-6015 大阪府大阪市中央区城見一丁目2番27号

クリスタルタワー15階

氏名 (7828) 弁理士 山本 稲策

電話（大阪）06-6949-3910



#### 4. 棄正対象書類名

請求の範囲

#### 5. 補正對象項目名

請求の範囲

## 6. 検正の内容

請求の範囲を別紙のとおり補正します



卷之三

## 請求の範囲

1. タキサンアナログ、ジメチルアセトアミド (DMA) 、ポリエチレンギリコール (PEG) 、および水性脂質乳濁液を含む、非経口投与のための薬学的組成物。
2. 前記タキサンアナログがパクリタキセルである、請求項 1 に記載の薬学的組成物。
3. 前記タキサンアナログが約 1 mg/ml ~ 約 5 mg/ml の濃度である、請求項 1 に記載の薬学的組成物。
4. 前記水性脂質乳濁液が大豆油乳濁液である、請求項 1 に記載の薬学的組成物。
5. 前記PEGが約400の分子量を有する、請求項 1 に記載の薬学的組成物。
6. DMA およびPEGを約1:3 (v/v) の比で含むとさらに規定される、請求項 1 に記載の薬学的組成物。
7. 脈管内投与のためのパクリタキセル組成物を調製する方法であつて、以下の工程：
  - パクリタキセルをDMA中に約100mg/mlまでの濃度で溶解する工程；
  - パクリタキセル溶液にポリエチレンギリコール (PEG) をDMA : PEGの比で約1:3 (v/v) で添加して、約25mg/mlパクリタキセルまでの濃度を有するパクリタキセルストック処方物を達成する工程；および
  - 水性脂質乳濁液を添加して、約 1 mg/ml ~ 約 5 mg/ml のパクリタキセル濃度を達成する工程、  
を包含する、方法。
8. 請求項 7 に記載の方法により調製される薬学的組成物。

9. バクリタキセル感受性腫瘍を処置するための組成物であつて：

約1:3 (v/v) のDMA：PEG比でジメチルアセトアミド (DMA) およびポリエチレングリコール (PEG) を溶解し、そして約1mg/ml～5mg/mlの最終バクリタキセル濃度を達成するように最終的に水性脂質乳濁液中に溶解されたバクリタキセルを含む、組成物。

10. 前記腫瘍が被験体の中にあり、そして前記薬学的組成物が非経口的に投与される、請求項9に記載の組成物。

11. 前記被験体が、ヒトの卵巣ガン患者、乳ガン患者、悪性リンパ腫患者、肺ガン患者、またはカボージ肉腫患者である、請求項10に記載の組成物。

12. 前記組成物が、約135mg/m<sup>2</sup>体表面～約250mg/m<sup>2</sup>体表面の投薬量で投与される、請求項9に記載の組成物。

13. 約25mg/mlバクリタキセルおよび1:3のv/v比のジメチルアセトアミド：ポリエチレングリコールを含む、バクリタキセルストック処方物。

14. 前記ポリエチレングリコールが、約400の分子量を有する、請求項13に記載のバクリタキセルストック処方物。